



Schnell im Blick

Welche Allergene befinden sich im Lebensmittel?

Europaweit müssen 15 verschiedene Allergene als Lebensmittelzutat gekennzeichnet werden. Darunter befinden sich auch umfangreiche Gruppen wie Fische, Krustentiere, Weichtiere oder Baumnüsse. Ein besonderes Risiko stellen „versteckte“ Allergene dar, die sich für den betroffenen Allergiker unvermutet in einem Lebensmittel befinden. Im Fall von Erdnuss oder Soja ist bekannt, dass bereits geringste Mengen im Spurenbereich sehr heftige Reaktionen auslösen können. Daher ist es wichtig, dass Produkte wie z. B. Schokoladen, Kekse und andere Süßwaren auf die Präsenz dieser und anderer Allergene untersucht werden können.

Wie lässt sich diese Vielfalt analytisch möglichst schnell und einfach erfassen? Mit dieser Frage beschäftigte sich ein am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

initiiertes und durch das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) gefördertes Forschungsprojekt. Das Projekt wird vom BfR koordiniert, Verbundpartner aus der Industrie sind das Institut für Produktqualität (ifp, Berlin) und die Zentis GmbH und Co KG (Aachen).

Zwei Strategien führen zum Ziel

Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten viele Lebensmittelproben in kurzer Zeit zu untersuchen. Entweder die Einzelanalyse wird zeitgleich drastisch verkürzt, oder mehrere Substanzen werden parallel in einem Analysegang gleichzeitig erfasst.

Einfach in der Handhabung und hochempfindlich sind immunologische „Dip-Stick“-Tests. Ein mit Antikörpern belegter Teststreifen wird in den Lebensmittelextrakt getaucht und binnen Minuten ist der qualitative Nach-

info

Kennzeichnungspflicht für 15 Allergene und Allergengruppen als Zutat in Lebensmitteln – VO (EU) 1169/2011

Tierische Allergene

- Milch
- Eier
- Fisch
- Krustentiere
- Weichtiere

Pflanzliche Allergene

- Soja
- Senf
- Sellerie
- Sesam
- Lupine
- Gluten (Getreide)
- Erdnuss
- Baumnüsse:
Mandel, Hasel-,
Wal-, Cashew-,
Macadamia-
Nuss, Pistazie

Chemische Stoffe

- Schwefeldioxid
- Sulfid

weis eines gesuchten Allergens möglich (Abb. 1). Die Tests können direkt vor Ort ohne apparativen Aufwand eingesetzt werden und sind dadurch sehr gut in der Selbstkontrolle im Lebensmittelbetrieb einsetzbar. Im Rahmen des Projektes wurden am ifp mehr als zwanzig Teststreifen gegen verschiedene Allergene entwickelt und Lücken in der Verfügbarkeit geschlossen. Ein neu entwickelter Extraktionspuffer ermöglicht das Herauslösen der Allergene in kürzester Zeit auch aus schwierigen Materialien wie Schokoladen. Die gesamte Analyse – von der Extraktion bis zum Messergebnis – ist in nur zehn Minuten abgeschlossen. Die Empfindlichkeit der Tests liegt je nach Allergen bei ein bis zwei Milligramm pro Kilogramm.

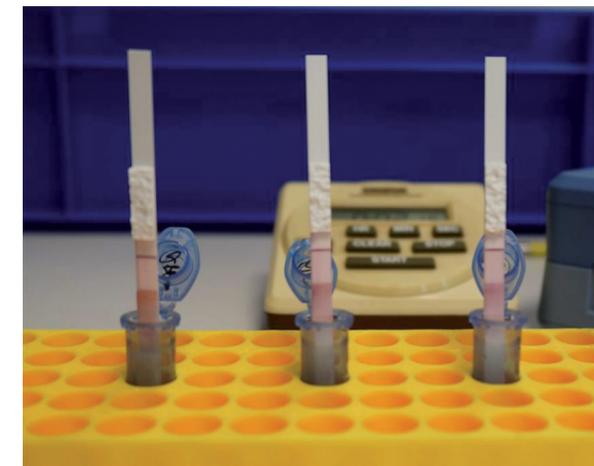


Abbildung 1: Schnell und einfach – Streifentests zum Nachweis von Allergenen. Im vorliegenden Fall erscheint nur eine Linie bei allen Teststreifen. Bei einem positiven Befund würde noch eine zweite Linie sichtbar. Die Proben in diesem Beispiel enthielten keine messbaren Spuren des gesuchten Allergens.

Nachweis der Erbsubstanz als Alternative zu Antikörpern

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist die Methode der Wahl wenn es um den spezifischen Artennachweis von DNA aus Tier- und Pflanzenarten geht. DNA ist ein äußerst stabiles Molekül und kann daher auch noch aus stark verarbeiteten Lebensmitteln extrahiert werden, in welchen die Proteine zum größten Teil zerstört sind und daher kaum noch nachgewiesen werden können. Anschließend wird in der PCR ein für die gesuchte Art spezifischer Bereich der DNA angereichert und mit einem Farbstoff markiert. Der fluoreszierende Farbstoff ergibt in einer Echtzeit- oder „Real-time“ PCR Apparatur während der Kettenreaktion ein messbares Signal, wenn sich die gesuchte Tier- oder Pflanzenart im Lebensmittel befindet. Auf diese Weise lässt sich auch die Gegenwart von Allergenen feststellen. Hierzu werden kurze DNA-Fragmente benötigt, die als sogenannte Primer und Sonden an beiden Enden der gesuchten DNA-Sequenz binden. Vorteile der PCR-Methode sind, dass der Anwender nicht auf die Verfügbarkeit von Antikörpern angewiesen ist und mehrere Allergene parallel in einem Ansatz untersucht werden können. Damit ist die PCR ideal als Übersichtsverfahren („Screeningverfahren“) geeignet und füllt methodische Lücken, wenn Antikörper gegen ein Allergen noch nicht verfügbar sind. Dies trifft beispielsweise bei Sellerie zu. Bis heute gibt es noch keine käuflichen immunologischen Tests zum Nachweis von Sellerie als versteckte Zutat in Fleischwaren.

„Sieben auf einen Streich“

Die Idee dieser Methode ist einfach. Auf einer Standard-PCR-Reagenzienplatte (Abb. 2 a bis c) werden verschiedene Nachweissysteme (Primer und Sonden) vorbelegt und

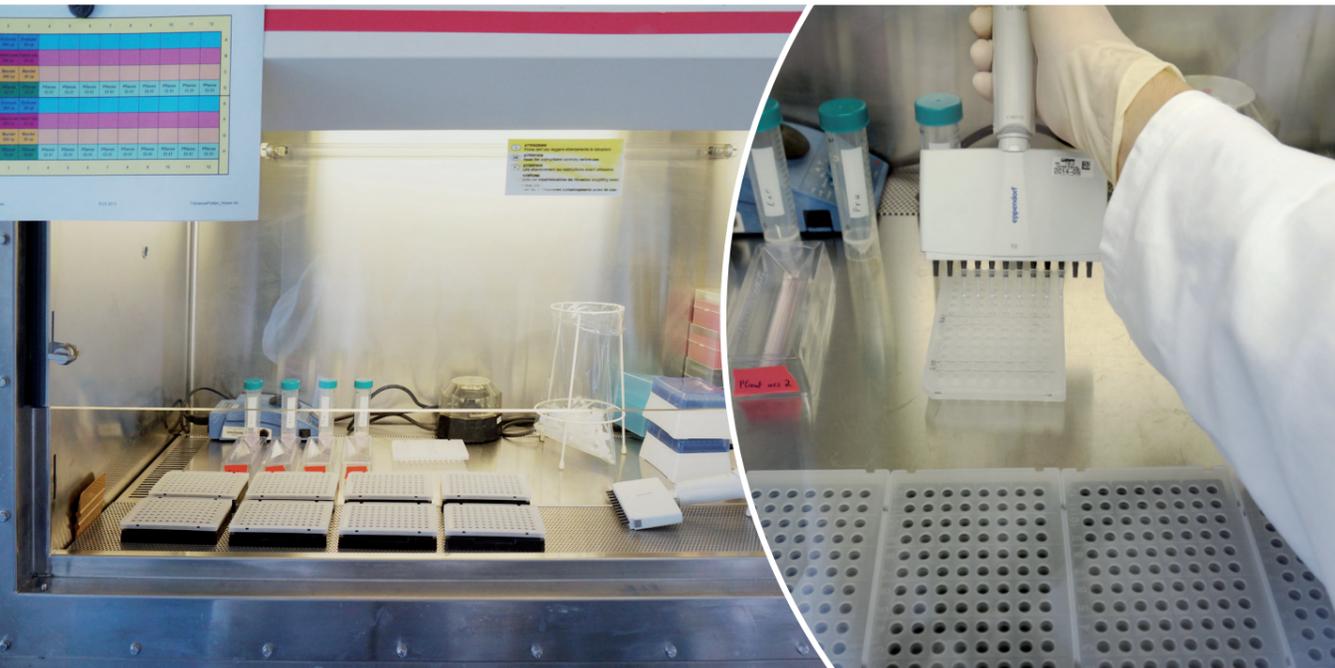


Abbildung 2 a/b: Vorkonfektionierte PCR-Platten müssen vor der Verwendung im Labor sorgfältig vorbereitet werden

getrocknet. Dabei ist die Auswahl der PCR-Systeme beliebig und je nach Produktgruppe – beispielsweise Süß- und Backwaren – flexibel gestaltbar. In einem einzigen DNA-Extrakt aus dem Lebensmittel lassen sich auf diese Weise sieben verschiedene Allergene gleichzeitig erfassen. Vorstellbar ist jedoch auch der Einsatz von größeren Platten mit entsprechend mehr PCR-Systemen. Die Kombinationsmöglichkeiten sind vielfältig. Einzige Einschränkung ist die notwendige Anpassung aller PCR-Systeme auf ein einheitliches Zeit- und Temperaturprogramm. Das ist in der Regel kein großes Problem, da die meisten dieser PCR-Systeme ohnehin auf eine Standardreaktionstemperatur von 60 ± 2 Grad Celsius eingestellt sind. Kleinere Testmengen von zehn bis fünfzig parallel zu pipettierenden Platten lassen sich noch leicht per Hand produzieren. Für größere Mengen empfiehlt sich ein Pipettierroboter. Einmal hergestellt, liefern die PCR-Platten reproduzierbare Ergebnisse in jedem Lauf.

Die Schutzsubstanz Trehalose – Vorbild aus der Natur

Damit die vorbelegten Platten mindestens ein Jahr bei Raumtemperatur haltbar sind, müssen die PCR-Reagenzien konserviert werden. Die schützenden Eigenschaften des natürlichen Zuckers Trehalose auf DNA und Proteine sind seit langem bekannt. So überleben z. B. mikroskopisch kleine „Bärtierchen“ (Tardigrada) mit Hilfe von Trehalose Hitze und Trockenheit in einem Dauerstadium (Abb. 3). Es lag auf der Hand, diese Substanz auch für



Abbildung 2c: „Ready-to-use“ PCR-Platten, getrocknet und versiegelt für mehrere Monate haltbar

den Schutz der empfindlichen PCR-Sonden zu nutzen. Es konnte gezeigt werden, dass eine geringe Menge von ca. 0,07 Prozent (Masse pro Volumen) vor dem Trocknen zugesetzt für einen effektiven Schutz der PCR-Komponenten ausreicht. Die Ergebnisse eines Temperaturstress-experiments lassen erwarten, dass für den Gebrauch vorbelegte PCR-Platten bis zu zwei Jahre bei Raumtemperatur haltbar sind.

Vielfältig und problematisch – Krebs- und Weichtiere

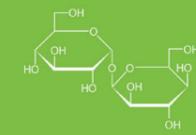
Für diese Tiergruppen findet man in der Literatur nur wenige oder überhaupt keine geeigneten PCR-Sys-

Platten vorbelegt mit:

- Primer
- Sonden
- Kontrollen

+

Trehalose



Allergene in Süßwaren:



- Erdnuss
- Mandel
- Haselnuss u. a.

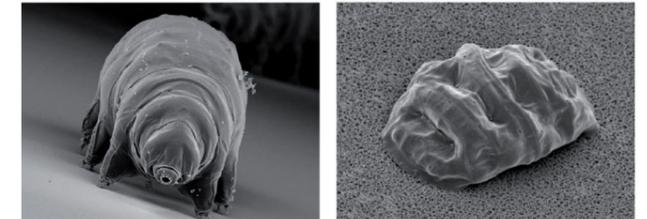
Allergene in Fleischwaren:



- Sellerie
- Senf
- Glutenhaltige Getreide u. a.

Schutz durch Trehalose – ein natürliches Disaccharid

Geschützt durch Trehalose:



„Bärtierchen“ aktiv und als dehydriertes „Tönnchen“

(Foto: Schill & Hengherr, Universität Stuttgart)

Abbildung 3: Zum Nachweis müssen nur noch DNA-Polymerase/Puffer + DNA aus dem Lebensmittel pipettiert werden. Bärtierchen überleben Kälte und Trockenheit durch Trehalose. Das natürliche Disaccharid schützt auch die empfindlichen PCR-Reagenzien

teme. Im Rahmen des Projektes wurden daher neue PCR-Methoden für den Nachweis von Geißelgarnelen (*Penaeidae*), Hummerartigen (*Nephropidae*), Rosenberggarnelen (*Macrobrachium rosenbergii*), Nordseekrabben (*Cragon crangon*), Taschenkrebse (*Cancer pagurus*), chinesischen Wollhandkrabben (*Eriocheir chinensis*) sowie Oktopus/Miesmuscheln (*Octopus vulgaris/Mytilus edulis*) entwickelt. Fazit: für Krebstiere ist mit einer intelligenten „Ready-to-use“-Kombination die Erfassung der wichtigsten Handelsarten in Deutschland möglich. Die prinzipielle Eignung des Tests für die Routineanalytik konnte an Handelswaren demonstriert werden. Mit einer Kombination von fünf verschiedenen PCR-Systemen, welche zum Teil mehrere Krebsarten zugleich erfassen, ließen sich die auf den Handelsprodukten (Suppen, Snacks, Saucen etc.) angegebenen Krebstierarten eindeutig identifizieren.

Anwendung in der Praxis

Die „Ready-to-use“-PCR ist eine einfache und wirkungsvolle Methode, um viele Allergene parallel im Lebensmittel aufzuspüren. Für Erdnuss konnte gezeigt werden, dass auch noch im unteren Spuren-Bereich von zwei bis zehn Milligramm pro Kilogramm ein Nachweis möglich ist. Das Prinzip des Verfahrens ist publiziert und kann bereits heute in jedem Labor adaptiert werden.

Der Weg zu einem anerkannten Standardverfahren verläuft über einen Ringversuch mit externen Labo-

ren. Im Oktober 2013 erfolgte der Versand von neun Schokoladen- und Keksprouben mit unbekannter Erdnuss-Einmischung im Spurenbereich an elf Ringversuchspartner in Europa. Ziel des Ringversuches ist die Ermittlung der Robustheit und somit Praxistauglichkeit des Verfahrens.

Die Projektfortschritte wurden auf zwei Workshops (Dezember 2010, November 2012) gemeinsam mit allen Projektpartnern und dem bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, (LGL, Oberschleißheim) vorgestellt sowie in Publikationen, Vorträgen, und Postern präsentiert. Das Projekt zeigt, wie Allergene in Lebensmitteln mit modernen Methoden erfasst werden können und bietet schnelle Nachweismöglichkeiten für die Praxis.



Dr. Jutta Zagon, Hermann Broll, J. Dittmer,
Dr. Anke Ehlers, Prof. Dr. Dr. Alfonso Lampen
Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin

E-Mail: jutta.zagon@bfr.bund.de